

## FISIOLOGIA CELULAR

## USO DE CELULAS MADRE EN LA TERAPEUTICA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: DESDE LA CIENCIA BASICA A LA APLICACIÓN CLINICA.

### Parte II: Interés Inmunológico de las células madre Mesenquimatosas

Fernando Zeledón S. \*  
 Carlos Escalante G. \*\*  
 Orlando Morales M. \*\*\*  
 Edgar Méndez J \*\*\*\*

#### SUMMARY

The last decade has seen great strides in the drug treatment of myocardial infarction and consequent heart failure, with associated improvements in quality of life, haemodynamics and survival. Despite this, the benefits of pharmacotherapy are limited in more severe cases, and mortality and morbidity remain high. The ability to replace damaged myocardium by use of stem cell therapy offers a new and potentially exciting treatment modality, but its benefits are at present far from established. While clinical trials explore cells derived from skeletal muscle and bone marrow, basic researchers are investigating sources of new cardiomyocytes, such as resident myocardial progenitors. Here, we briefly review the use of bone marrow derived and cardiac

derived stem/progenitor cells in myocardial regeneration studies. We also discuss the challenge of translating basic cellular and molecular mechanism into effective, clinically relevant options.

#### INTRODUCCIÓN

En noviembre del 2000, un estudio realizado por Liechty et al.(28) fue publicado en la prestigiosa revista Nature Medicine, en el cual células madre mesenquimatosas (CMM) humanas fueron implantadas en un feto de oveja, en forma temprana durante la gestación. En este sistema xenogénico, las CMM se injertaron y persistieron en múltiples tejidos por al menos 13 meses des-

pués del trasplante. Se demostró diferenciación dirigida por tejido en condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, etc. El embarazo ovino dura al menos 45 días, y es conocido que, después de los 85 días de la gestación, el cordero es capaz de rechazar tanto piel alo o xenogénica; así como otros trasplantes celulares. Así, fue sorprendente para los investigadores encontrar que las CMM humanas implantadas no fueron rechazadas sin ningún tipo de inmunosupresión, incluso después de la maduración del sistema inmunológico fetal, sobreviviendo y diferenciándose en múltiples fenotipos. No obstante, como estos experimentos fueron realizados en fetos, ¿se podría demostrar tales hallazgos en

\* Prof. Fisiología Departamento de Fisiología. Universidad de Ciencias Médicas UCIMED. San José. Costa Rica. Programa de Maestría en Fisiología de Sistemas.

\*\* Programa de Maestría en Fisiología de Sistemas U.C.R. Gineco-obstreta. Hospital San Juan de Dios.

\*\*\* Profesor de Fisiología. Jefe Departamento de Fisiología. Universidad de Ciencias Médicas UCIMED. San José, Costa Rica.

\*\*\*\* Profesor de Cirugía, Universidad de Ciencias Médicas UCIMED. Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital México.

animales adultos totalmente inmunocompetentes?

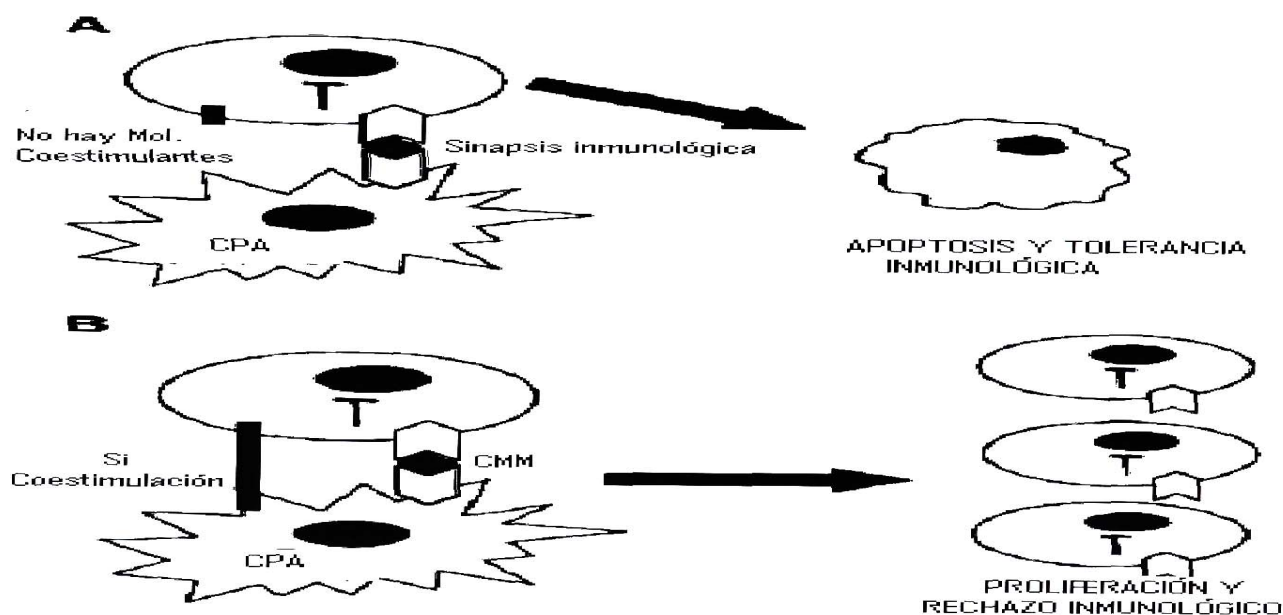
En el 2002, en la revista *Annals of Thoracic Surgery*(44), se publicó un estudio en el cual CMM de ratones fueron marcadas e implantadas intravenosamente en ratas adultas Lewis sin inmunosupresión. Después de algunos días, fue confirmado que las CMM provenientes de los ratones habían anidado en la médula ósea de las ratas. Seguidamente se ligó la arteria coronaria izquierda de las ratas y las muestras de tejido cardiaco fueron examinadas por al menos ocho semanas. Se demostró que las células madre mesenquimatosas marcadas fueron reclutadas, viajaron vía sanguínea hacia el corazón de las ratas y se anidaron en dicho tejido en las zonas peri-infarto. En las siguientes cuatro a seis semanas, las células marcadas se diferenciaron en varios fenotipos, tales como miocitos cardiacos, células endoteliales y células de músculo liso. En contraste con las CMM, cuando se transplantaron fibroblastos de la piel de ratones (células diferenciadas) en el miocardio de las ratas, los fibroblastos xenogénicos fueron rechazados dentro de cuatro a cinco días, con una respuesta inflamatoria enérgica, en el sitio del trasplante. Con respecto al trasplante alogénico de células madre adultas en el 2001, Caparelli et al.(9) y Makkar et al.(30) en el 2002, realizaron injertos de CMM entre cerdos no relacionados genéticamente. A los animales que iban a ser transplantados, se les ligó la arteria coronaria izquierda antes de la administración de las células; pero en ningún momento se indujo a la inmunosupresión. Las

células madre permanecieron viables y diferenciadas sin ser rechazadas y además la función cardiaca mejoró después del trasplante de las CMM, con respecto de los grupos controles. Por otro lado, estudios realizados por Min et al.(35) y Behfar et al(5), tomaron células madre provenientes de ratones embrionarios; y luego, fueron transplantados en corazones de ratas después de provocarles un infarto cardiaco. Se reportó células madre sobrevivientes en el miocardio, además de evidencia miogénica y vasculogénica, diferenciación y mejoría funcional del miocardio.

Haider et al(17) también reportaron que mioblastos humanos transplantados en corazones de cerdo infartados, requirieron inmunosupresión leve y momentánea y se confirmó la supervivencia y diferenciación de estas células sin rechazo inmunológico. Los mecanismos propuestos para los resultados de estos ensayos, radican en las características de que las CMM podrían inducir tolerancia inmunológica, mediante la inhibición directa de los linfocitos T alorreactivos o podrían producir células supresoras. Se relacionaron el HGF y el TGF-beta como mediadores de los efectos tolerogénicos de las CMM. Además, se sabe que las CM presentan muy poca expresión del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie celular; en especial, los de clase II. Otra característica que es distintiva de cualquier otro tipo de trasplante de órganos con respecto al de CM es que en dicho trasplante (de CM) se pierde la vasculatura (y por lo tanto células endoteliales) y la presencia de cé-

lulas presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas y macrófagos.(17,10) Por ejemplo, en un xenotrasplante en donde se utiliza un corazón de cerdo en un humano, los anticuerpos circulantes presentes en humanos se unen a los epítomos Gal 1 alfa y Gal 3 expresados en las células endoteliales, lo cual conduce a lesión endotelial, edema, hemorragia, y rechazo del órgano transplantado; y este no es el caso del trasplante meramente de células. Por otro lado, la pérdida de los linfocitos del donador reducen el riesgo del rechazo injerto vs huésped.(10)

Ahora bien, ya conocemos que las células bien diferenciadas (tales como cardiomiocitos) cuando son transplantadas en xeno o alo recipientes son rechazadas; por lo tanto, por qué permanecen los cardiomiocitos, células endoteliales o células de músculo liso totalmente diferenciados (que provienen de las células madre) sin ser rechazados, porque como células ya diferenciadas expresan, en su totalidad, los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad? Para contestar esta pregunta, debe referirse brevemente a las dos sinapsis inmunológicas que existen en cuanto al rechazo celular. La primera es una señal de "reconocimiento", en la cual intervienen la célula presentadora de antígeno, con la molécula de histocompatibilidad clase II y el antígeno expuesto, y por otro lado, la célula T con el receptor de la célula T en la superficie celular de dicha célula. La segunda sinapsis inmunológica es de "activación" y está conformada por la unión de moléculas denominadas coestimulantes, de las cuales



**Figura 5.** Sinapsis inmunológicas que promueven el rechazo de un órgano o tejido. La primera sinapsis está mediada por el receptor de la célula T que se encuentra en la superficie celular de los linfocitos T, el antígeno y el complejo mayor de histocompatibilidad que se encuentra en la superficie celular de las células presentadoras del antígeno (CPA). Por otro lado, la segunda sinapsis inmunológica está mediada por moléculas denominadas coestimulantes, vitales para que se de el rechazo inmunológico. Las células madre (en especial las mesenquimatosas, CMM), no poseen moléculas coestimulantes y además muy pocos complejos de histocompatibilidad clase II. En A, tolerancia inmunológica; en B, rechazo inmunológico<sup>10</sup>

las más estudiadas son la superfamilia B7/CD28. (10) (figura 5) Matzinger et al (31,32) en una serie de experimentos, propusieron que las moléculas coestimulantes en la sinapsis inmunológica, se expresan ante "moléculas peligrosas" procesadas por la primera sinapsis. De este modo, en un estudio representativo, estos investigadores cocultivaron in vitro células presentadoras de antígenos y células T in vitro. Cuando las células normales o células que fallecían vía apoptosis desencadenada por eventos fi-

siológicos se agregaban al medio, no hubo activación o proliferación de células T. No obstante, cuando las células necróticas o citoquinas de estrés fueron agregadas al cultivo, los linfocitos T fueron activados y proliferaron con rechazo de los antígenos agregados. Por lo tanto, se entiende que las "moléculas estresantes o peligrosas" fueron fagocitadas por las células presentadoras de antígeno, las cuales expresaron moléculas coestimulantes en su superficie celular, señalando que existe "peligro en

el microambiente celular". Dentro de este contexto, el rechazo inmunológico de un corazón transplantado por el huésped, no es debido solamente a la incompatibilidad de los antígenos del complejo de histocompatibilidad del órgano donador; sino también por la presencia de "señales peligrosas" que activan las moléculas coestimulantes, las cuales son necesarias para que ocurra cualquier rechazo inmunológico. Estas señales podrían estar desencadenadas por la agresión tisular que conlleva un

procedimiento quirúrgico. (10,31) Por lo tanto, en un trasplante de células madre mediante una inyección directa en el miocardio, ya una vez que las células se han diferenciado, la agresión quirúrgica ha sido subsanada y no existen moléculas dañinas que fomenten la activación de las moléculas coestimulantes, aunque posiblemente se expresen los antígenos extraños de los complejos ya existentes en dichas células diferenciadas, tales como los nuevos cardiomiocitos. La validación de tales observaciones y la elucidación de los demás mecanismos y condiciones para la inmunotolerancia podría conducir al uso de tales células como donadores universales en una futura terapia regenerativa. La inconveniencia logística y económica del actual tratamiento autólogo de las células madre, para la terapia celular miocárdica podría evitarse, y las complicaciones y costos de la inmunosupresión requerida para la implantación de células diferenciadas alogénicas y xenogénicas sería minimizada. Las CM saludables de personas jóvenes podrían utilizarse para el tratamiento de ancianos o pacientes debilitados o incluso células xenogénicas; ya que según las encuestas no existe el rechazo psicológico ante un trasplante de células xenogénicas, como sí al de un órgano completo de otra especie animal.(10,51)

### ORÍGENES ALTERNATIVOS EN LA OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS.

Células multipotentes con la capacidad de autorrenovación han sido descritas en el tejido adiposo, y este se convierte en una alternativa que permite extraer gran volumen de tejido, con una morbilidad muy limitada. Dichos trabajos iniciaron en el 2001 y continuaron incluso con la transdiferenciación de dichas células a cardiomiocitos, en el 2003(53) Los marcadores de superficie celular de células madre derivadas del tejido adiposo (CMDTA), son muy parecidos a otras células mesenquimatosas; como por ejemplo, las células estromales derivadas de médula ósea. No obstante, existen algunas diferencias, tales como que las CMM poseen el CD140 (receptor del factor de crecimiento plaquetario), mientras no es así con las CMDTA. También existe una relación inversa entre la expresión de CD106/VCAM-1 y CD49d/ VLA-4; ya que las CMDTA expresan el primero, pero no el segundo grupo de proteínas, y lo contrario ocurre con las CMM derivadas de médula ósea. Además, se cree que las CMDTA presentan mayor tasa de proliferación, lo cual permitiría que se pueda alcanzar un número adecuado de células madre, para así regenerar la cantidad suficiente de tejido cardiaco.(53)

### C ONCLUSIÓN

El potencial de las células madre mesenquimatosas para ser usados en el tratamiento de miocardios isquémicos o insuficientes encuentra en evaluación clínica. Dentro de esta línea ha tomado gran interés el uso de células madre derivadas de tejido adiposo, siendo “paradójico” utilizar como aliado a uno de los “peores enemigos de la cardiología”. La liposucción es uno de los procedimientos cosméticos más populares alrededor del mundo; y aunque se extrae gran volumen de tejido adiposo, los aspirados de liposucción no han sido bien investigados para el uso en situaciones clínicas. Además, encuentra bien establecido que el tejido adiposo presenta mayor número de CM que el tejido hematopoyético y que el aislamiento de las CMDTA es sencillo y rápido, incluso para permitir el trasplante autólogo de células madre a partir de este origen en un individuo con un síndrome coronario agudo. Por otro lado, la pérdida de rechazo inmunológico podría permitir el uso de células alogénicas o incluso xenogénicas en varias áreas de la terapia de regeneración tisular y por lo tanto, se están convirtiendo en una de las terapias con mayor esperanza en la ayuda de pacientes en riesgo o con afectación de enfermedades cardiovasculares